Lane Medical Library

(Aus der II. medicinischen Universitätsklinik zu Berlin.)

Das menschliche Sputum als Nährboden für Bakterien.

INAUGURAL-DISSERTATION

WELCHE

ZUR ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

IN DER

MEDICIN UND CHIRURGIE

MIT ZUSTIMMUNG

DER MEDICINISCHEN FACULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

am 6. März 1894

NEBST DEN ANGEFÜGTEN THESEN

ÖFFENTLICH VERTHEIDIGEN WIRD

DER VERFASSER

Willibald Steffen

aus Soldin (Neumark).

OPPONENTEN:

Hr. Dr. med. Brasch.
- Cand. med. Fast.
- Cand. med. Henning.

BERLIN.

Buchdruckerei von Gustav Schade (Otto Francke).

Linienstrasse 158.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet.

Man kann zwanglos die Klasse der Nährböden für bakteriologische Züchtungsversuche zwiefach teilen: in die natürlichen und in die künstlichen Nährböden und unter den ersteren solche verstehen, welche, so wie sie uns die Natur liefert, ohne Veränderung ihrer chemischen Zusammensetzung direkt zu Kulturzwecken verwendet werden können. Die künstlichen Nährböden dagegen sind aus verschiedenen Substanzen hergestellte Medien, deren chemische Zusammensetzung möglichst so geartet sein soll, dass sie allen Bakterien ein annähernd gleich-günstiges Wachstum gestattet. Sind die bisher gebräuchlichen natürlichen Nährböden nur wenige wie Erde, Kartoffeln, Eier, Milch, Blut, Blutserum, Harn etc., so ist die Zahl der künstlichen Nährsubstrate mit ihren oft recht subtilen Modifikationen fast Legion.

Es ist von grossem Interesse, in der Geschichte der bakteriologischen Forschung die Gesichtspunkte aufzusuchen, unter denen von den einzelnen Forschern neue Nährsubstrate in die Praxis eingeführt wurden, und so den Fortschritt zu den immer vollkommeneren Methoden von Stufe zu Stufe zu betrachten.

Pasteur[1]) benutzte bei seinen ersten Gährungsexperimenten als Nährböden Flüssigkeiten, welche in ihrer Zusammensetzung den ursprünglichen, Gährungs-Organismen enthaltenden Substanzen möglichst nahe

[1]) Mémoire sur la fermentation appelée lactique. Compt. rend. 1857, Bd. 45, S. 913.

kamen. Dass die Pasteur'sche Schule bis heute fast unentwegt an der Verwendung dieser Medien festgehalten, liesse den Schluss rechtfertigen, dass wir es hier mit Nährböden zu thun haben, die uns neben einem guten Wachstum der Bakterien auch eine Reinkultur der verlangten Art versprechen. Mag die erste Bedingung in den meisten Fällen erfüllt sein, die zweite ist es fast nie. Man erhält zwar schliesslich eine Reinkultur von irgend einem Mikroorganismus, aber selten von derjenigen Art, welche man isolieren wollte: eine der gewöhnlichen saprophytischen Arten hat eine andere empfindlichere verdrängt.

Diese Erfahrungen begründeten in der Folgezeit zwei Bestrebungen: Während auf der einen Seite nach sog. Normallösungen gesucht wurde d. h. Lösungen, die möglichst vielen Bakterienarten ein günstiges Wachstum gestatten sollten, glaubte man andererseits in denjenigen Medien, welche nur einer bestimmten Bakterienart gute Vegetationsbedingungen boten, wirksame Mittel zur Herstellung von Reinkulturen gefunden zu haben.

Man kann es erklärlich finden, dass von diesen beiden Principien das erste heutzutage fast ausschliesslich Berücksichtigung findet; denn nachdem man gelernt hatte, die einzelnen Keime sicher zu isolieren, kam es nur darauf an, jeden dieser Keime ebenso sicher zur Entwickelung gelangen zu lassen, um von jeder beliebigen Art eines Bakteriengemisches eine Reinkultur zu erhalten und durch Übertragung fortzuzüchten. Die meisten unserer heute gebräuchlichen Nährmedien wie Bouillon, Gelatine, Agar-Agar etc. genügen diesen Anforderungen und sind deshalb von unschätzbarem Werte.

Die Kartoffelkulturen, von Schröter[2]) zuerst eingeführt, von Koch wesentlich verbessert, bieten zum ersten

[2]) Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I. Bd., Heft 2, 1872, S. 109.

Mal gegenüber allen früheren Methoden den Vorteil einer isolierten lokalen Entwicklung der Keime; sie liefern durch weitere Übertragung derselben noch so lange Reinkulturen, als die aus einem Keime hervorgegangenen Kolonieen isoliert und somit rein sind, haben aber den Nachteil, dass nicht alle Bakterienarten gleichmässig zur Entwicklung gelangen, und dass viele derselben wegen ihres wenig augenfälligen Wachstums schwer aufzufinden und noch schwerer zu beobachten sind.

Die Gelatine-Kulturen von Klebs und Brefeld[3]) sind hauptsächlich für direkte mikroskopische Untersuchung bestimmt und verhindern eine Bewegung und Verdunstung der Flüssigkeit, welche früher bei Beobachtung der Bakterien im hängenden Tropfen die störenden Momente gebildet. Mit besonders zu diesem Zweck hergerichteten Objektträgern kombiniert, liefern diese Kulturen für die mikroskopische Beobachtung entwicklungsgeschichtlicher Phänomene an Bakterien befriedigende Resultate. Die Einführung der Gelatine zur Herstellung fester Nährböden bildet in der Geschichte der Bakteriologie einen bedeutenden Schritt vorwärts, aus welchem die notwendigen Consequenzen zu ziehen der neusten Zeit vorbehalten blieb.

Interessant sind die Versuche von Salomonsen[4]) mit seinen Kulturen auf Blut in Kapillarröhrchen, interessant insofern, als er einen natürlichen Nährboden ohne jede Beimengung anderer Substanzen mit Erfolg benutzte.

---

[3]) a. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Bd. I, 1872, S. 10. b. Methoden zur Unters. der Pilze. Verh. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg N. F. VIII. Bd., 1874/75, S. 43. c. Kulturmethoden zur Unters. der Pilze. Botan. Unters. Bd. IV, 1881, S. 1.

[4]) a. Zur Isolation differenter Bakterienformen. Botan. Zeit. 1876, No. 39. b. Eine einfache Methode zur Reinkultur verschiedener Fäulnisbakterien. Botan. Zeit. 1880, No. 28. c. Bakteriolog. Technik 1885.

Jedoch hat auch diese Methode ihre Mängel und Unbequemlichkeiten und verlangt grenzenlose Exaktheit und Sauberkeit beim Arbeiten; hierin mag auch wohl der Grund ihrer heutigen geringen Anwendung zu suchen sein.

Erst Koch[5]) ist es in neuerer Zeit geglückt, alle die vereinzelten Vorzüge früherer Nährböden geschickt zu kombinieren und uns eine Gattung von Medien zu schenken, welche einem wichtigen Zweige bakteriologischer Forschung einen neuen Aufschwung verlieh. Die Lösung des grossen Rätsels bestand einfach darin, dass die Koch'schen Nährböden durchsichtig und fest waren, d. h. also sowohl makro- und mikroskopische Beobachtung als auch völlige Isolation und getrennte Entwicklung der Keime gestatteten.

Während durch die nach diesem Princip entdeckten und modificierten Lösungen wie Nährgelatine und Agar allen Anforderungen, die man im Laufe der Zeiten an gute künstliche Nährböden zu stellen gelernt, Rechnung getragen zu sein schien, bekundete der Versuch der Fortzüchtung von Tuberkelbacillen ausserhalb des Tierkörpers unzweideutig wiederum den Wert der natürlichen Nährsubstrate. Auch hier gebührt Koch das grosse Verdienst, mit dem Blutserum gewissermassen das Ideal eines natürlichen Nährbodens in die bakteriologische Praxis eingeführt zu haben.

Unter den natürlichen Medien verdienen besondere Berücksichtigung diejenigen, welche mit dem tierischen Körper in Zusammenhang stehen und besonders für die Züchtung pathogener Bakterien in Betracht kommen. Eigentlich ist es hier nur das Blutserum gewesen, welches bisher eine verbreitete Anwendung gefunden und den hohen Wert dieser Kategorie offenbarte.

[5]) Zur Unters. von pathogenen Organismen. Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. I, 1881, S. 1.

Schon Brefeld[6]) wies 1881 darauf hin, dass „eine Nährlösung, welche diejenigen Substanzen gelöst enthält, die in einem festen Substrate, worauf ein Pilz in der Natur vorkommt, sich finden, auch mit aller Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Substrat für die Entwicklung des Pilzes abgeben wird. Wie nun, wenn man dies Substrat selbst als Nährboden benutzte, vorausgesetzt, dass es eine Sterilisation besteht, ohne seine chemische Constitution zu ändern?

Wenn wir im menschlichen Organismus die Fundstätten pathogener Bakterien — denn um diese handelt es sich hier ausschliesslich — aufsuchen, so werden wir finden, dass wohl jedes Organ Sitz der verschiedenartigsten Mikroorganismen werden kann. Demzufolge sind auch die Ex- und Sekrete des Menschen wie Fäces, Harn, Speichel, Sputum und Schweiss bei denjenigen Infektionskrankheiten, deren Erreger wir bisher kennen, je nach dem Sitz des Leidens mehr oder weniger mit Bakterien angefüllt.

Um das lebende tierische Gewebe zum Nährboden für Mikroorganismen zu machen, dazu dient das Tierexperiment, welches in diesem Falle einem Versuch auf irgend einem Nährsubstrat im Reagenzglase gleichsteht: beide Methoden liefern uns Reinkulturen.

Unter den Ex- und Sekreten des menschlichen Organismus nimmt das Sputum eine wichtige Stelle ein, weil es bei verschiedenen Infektionskrankheiten in hervorragendem Maasse Sitz der specifischen Erreger ist. Im folgenden soll uns die Frage nach dem Wert des Sputums als Nährboden für Bakterien näher beschäftigen.

Soweit ich die bakteriologische Litteratur durchsucht habe, ist man bisher niemals auf den Gedanken ge-

[6]) Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Heft IV, 1881, S. 5.

kommen, das menschliche Sputum als Nährboden zu verarbeiten. Was daran die Schuld tragen mag, die Schwierigkeiten bei der Herstellung oder bei der Sterilisation dieses Mediums, lässt sich nicht sagen, jedenfalls ist es auffällig, dass eine so naheliegende Aufgabe niemals Gegenstand der Forschung wurde.

Das Sputum verdient als Absonderungsprodukt der Schleimhäute des Respirationsapparates eine besondere Würdigung und ist deshalb nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die Ätiologie vieler Lungenkrankheiten von unschätzbarem Werte. Nehmen wir z. B. an, dass verschiedene dieser Krankheiten durch Inspiration von Mikroorganismen erzeugt werden können, so werden dieselben naturgemäss zunächst mit irgend einem Teil der Schleimhaut des Respirationsapparates, die stets mit einem, wenn auch noch so feinem, Sekret der Drüsen bedeckt ist, in Berührung kommen und müssen hier für ihre Weiterentwicklung und Weiterverbreitung einen günstigen Boden finden. Auch vermag die nachgewiesene Thatsache, dass Tuberkelbacillen sowohl im flüssigen wie im eingetrockneten Sputum lange Zeit hindurch virulent bleiben können[7]), den Schluss zu rechtfertigen, dass der menschliche Auswurf für diese Art Bacillen einen guten Nährboden abgiebt. Zu den Mikroorganismen, die man im Sputum virulent und als Erreger bestimmter Infektionskrankheiten antrifft, gehören in erster Linie die Tuberkelbacillen, die Fränkel'schen Diplokokken als Erreger der genuinen fibrinösen Pneumonie und die Influenzabacillen, wenn man deren Existenz nach den neuesten Forschungen anerkennen will.

Als demnach Dr. Adolf Schmidt es zuerst unternahm, Bakterien auf Sputum zu züchten, hatte er für

[7]) Cornet, Die Verbreitung der Tuberkelbacillen ausserhalb des Körpers. Zeitschrift f. Hyg. Bd. V, S. 191, 1889.

ein Gelingen der Aufgabe die begründetsten Aussichten, und dass sie thatsächlich gelang, zeigt die kurze Mitteilung im „Centralblatt für klinische Medicin“ 1893 No. 30. Da leider Herr Dr. Schmidt seine begonnenen diesbezüglichen Arbeiten nicht weiter fortsetzen konnte, ergriff ich mit Freuden die Aufforderung, den angeregten Gedanken zu verfolgen und vorläufig zu einem gewissen Abschluss zu bringen.

Von den verschiedenen Sputis, die man nach ihrer makroskopischen Beschaffenheit in mehrere Gruppen geteilt, eignen sich zu brauchbaren Nährböden für Bakterien besonders das rein schleimige und das pneumonische Sputum. Schwierigkeiten bei der Sterilisation und bei der Verarbeitung zu festen Substraten lassen die übrigen Sputumarten für die angedeuteten Zwecke wenig brauchbar erscheinen.

Während der Fundort des schleimigen Auswurfes, welcher für beginnende Bronchitis charakteristisch ist, Trachea und Bronchen sind, entstammt im wesentlichen das pneumonische Sputum den Alveolen. Dieser Unterschied ist wichtig, wenn es sich darum handelt, die Wachstumsbedingungen von Bakterien an verschiedenen Orten des Respirationsapparates zu prüfen, was z. B. bei Pneumokokken von Belang wäre, welche, wie man weiss, im Speichel Gesunder vollvirulent vorkommen können, und welche, wie man daraus geschlossen, erst an späteren Partien der Atmungswege für den Organismus pathogenetisch werden.

Bei der Beurteilung von Nährböden haben wir zunächst die chemische Zusammensetzung des Mediums zu berücksichtigen, weil wir wissen, wie verschieden die Ansprüche der einzelnen Bakterienarten an ihre Nährsubstrate sein können und wie leicht manche auf die geringste Veränderung ihrer gewohnten Lebensbedingungen zu reagieren vermögen.

Eine Hauptforderung vieler Bakterienarten an Nährböden, die Alkalescenz derselben, sehen wir beim Sputum meistens von vornherein erfüllt. Aber so einheitlich und durchgehend diese Reaction sich zu finden pflegt, so wenig konstant zeigen sich die einzelnen chemischen Bestandteile in ihren Mengenverhältnissen, die weiter noch je nach Art und Ausdehnung pathologischer Prozesse nicht unbedeutend variiren. Wenn man bedenkt, dass der per os entleerte Auswurf mehr oder weniger von dem Speichel verschiedener Drüsen begleitet ist, der jedenfalls nicht ohne wesentlichen chemischen Einfluss auf das eigentliche Sputum bleibt, so wird man die Schwierigkeiten einer genauen chemischen Analyse desselben begreifen können und die Resultate, die derartige Untersuchungen geliefert haben, mit der nötigen Kritik aufnehmen.

Nach den wenigen Forschungen, die in dieser Richtung bisher angestellt sind, mag Folgendes als sichergestellt gelten:

Der Wassergehalt des Sputum, der selbstverständlich bedentenden Schwankungen unterworfen ist, bei Lungenödem z. B. hoch ansteigt, weniger reichlich in den ersten Stadien des Katarrhs und beim Emphysem ist, beträgt nach Biermer[8]) zwischen 882—979 pro mille.

Die Menge der vorhandenen Eiweissstoffe richtet sich nach dem entzündlichen Grade der Schleimhautaffektion und ist von der Anzahl der geformten Elemente abhängig. Ein myosinartiger Eiweissstoff soll vorwiegen[9]) und bei dem Absterben des Protoplasma gebildet werden. Genauere Daten finden sich in einer russischen Dissertation von Starkow[10]):

---

[8]) Biermer, Die Lehre vom Auswurf. Würzburg, 1885.

[9]) Bokay, Pester med.-chirurg. Presse. S. A. 1879.

[10]) A. Schmidt, Über Farbenreaktionen des Sputums. Berl. klin. Wochenschrift 1893, No. 10.

bei akuter Bronchitis	0,25—1,1	Proz. Eiweiss
bei chronischer Bronchitis	0,3 —1,45	- -
bei Emphysem	0,18—1,9	- -
bei kroupöser Pneumonie	0,35—2,9	- -
bei chronischer Pneumonie	0,47—3,48	- -
bei Lungenödem	2,94—3,33	- -

Prof. Müller's Analysen, welche in Breslau an ganz reinen Sputumarten vorgenommen wurden, sind auf die Trockensubstanz berechnet und ergaben in Prozenten:

	N.	Asche	Reducierende Substanz
Bronchitis (rein schleimig)	7,60 %	18,08 %	6,039 %
Bronchitis, chronisch (auf aschefreie Substanz berechnet)	9,27 -	—	7,37 -
Pneumonie	12,35 -	11,38 -	3,26 -
auf aschefreie Substanz berechnet	13,92 -	—	3,704 -

Prof. Müller bemerkt hierzu: „Die reducierende Substanz kann, wie ich glaube nachgewiesen zu haben, als Ausdruck des Mucingehaltes dienen. Sie ist nach Titrieren in dem von Eiweiss befreiten Medium als Traubenzucker berechnet. Freilich ist dies ganz willkürlich, denn Traubenzucker ist diese reducierende Substanz nicht. Ich habe diese Angabe nur gemacht faute de mieux."

Mucin, ein Derivat der Albuminate, ist das Produkt der im Innern der Schleimdrüsen liegenden eigentlichen Sekretionszellen („Schleimzellen") und stammt grösstenteils aus der Mundhöhle. Von grosser Wichtigkeit war die zuerst von Renk[11]) gefundene Thatsache, dass im bronchitischen Sputum unter den organischen Stoffen das Mucin, im pneumonischen dagegen Eiweiss vorwiegt.

[11]) Zeitschrift f. Biologie. XI, S. 102, 1875.

Ein hoher Fettgehalt der Sputa ist stets pathologisch und giebt, wie Kaatzer[12]) gezeigt hat, einen Massstab ab für den Nahrungsmangel des Lungengewebes. Die freien Fettsäuren entstammen entweder den käsigen Herden der kranken Lungen oder den Luftwegen; ihre Menge zeigt je nach den in verschiedenem Grade obwaltenden chemischen oder mechanischen Einflüssen nicht unbedeutende Schwankungen.

Über die anorganischen Bestandteile der Sputa liegen manche widersprechende Beobachtungen vor. Bamberger[13]) und Kussmaul[14]) stellten Chlor, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Kali, Natron, Kalk, Magnesia, Eisenoxydsalze und Siliciumverbindungen aus ihnen dar, die in ihren quantitativen Verhältnissen bei den einzelnen Sputum-Arten merklich differieren. Während z. B. Bamberger im pneumonischen Auswurf im Gegensatz zum katarrhalischen während der „Entzündungsperiode" keine Phosphorsäure nachzuweisen vermochte, aber den Kali-Gehalt vermehrt fand, stellte im Gegensatz hierzu H. Kossel[15]) eine Vermehrung der Phosphorsäure fest.

Diese zum grossen Teil unbestimmten, zahlenmässig noch wenig festgelegten Angaben werden genügen, um die Fülle und Mannigfaltigkeit des Nährmaterials zu begreifen, welches im Sputum den Bakterien für eine gedeihliche Entwicklung zugänglich ist. Zum nicht geringen Teil sind die schwankenden Quantitäten dieser chemischen Bestandteile, wie schon oben angedeutet, durch mehr oder weniger grosse Mengen morphotischer Elemente bedingt, die sich je nach der Intensität der herrschenden

---

[12]) Das Sputum und die Technik seiner Untersuchung. 1891.

[13]) Beitrag zur Lehre vom Auswurf. Würzb. med. Zeitschr. 1861, Bd. II.

[14]) Aschenbestandteile der Lungen. Deutsch. Arch. f. klin. Medicin, Bd. II.

[15]) Zeitschr. f. klinische Medicin. XIII, S. 149, 1888.

physiologischen oder pathologischen Prozesse der homogenen Grundsubstanz beigesellen. Hierher sind die Eiter- und Schleimkörperchen zu rechnen, die verschiedenartigen Epithelien des Mundes und Respirationsapparates, rothe Blutkörperchen, ferner elastische Fasern, Fibringerinnsel, die zahlreichen Krystallbildungen (Fettsäurenadeln, Cholestearin, Tyrosin, Asthmakrystalle etc.), Entozoen und eine grosse Reihe von Mikroorganismen. Auch mischen sich Speisereste aller Art in mikroskopischer und makroskopischer Grösse diesen Elementen in erheblicher Menge bei.

Von den Epithelien ist noch eine chemische Degenerationsform nachzutragen, die öfter vorkommt, die sog. Myelin-Entartung (Mischung der Fettsäure mit einem Alkali). Panizza[16]) hält dies Myelin für ein Produkt des Mucin, das sich in den Becherzellen findet, welche zuweilen die Epithelien der menschlichen Bronchialschleimhaut begleiten.

Die Wichtigkeit des Gegenstandes möge die folgenden speziellen Bemerkungen über das pneumonische Sputum rechtfertigen, während die Eigenschaften des katarrhalischen Sputums aus dem Gesagten sich leicht von selbst ergeben.

Im Verlaufe einer fibrinösen Pneumonie bringt auch das Sputum die einzelnen klinischen und pathologisch-anatomischen Stadien dieser Krankheit in den meisten Fällen deutlich zur Anschauung. In der ersten Periode, derjenigen der „Anschoppung", sind die Sputa, wenn überhaupt vorhanden, sehr spärlich, zähe, wegen des starken Mucin- und Albumingehaltes klebrig, durchsichtig, lufthaltig und infolge der geringen Blutbeimengung nur leicht gelblich gefärbt.

---

[16]) Deutsches Archiv f. klinische Medicin. Bd. 28, S. 243.

In dem zweiten Stadium, dem der Gerinnung des Exsudates, auf der Höhe der Krankheitserscheinungen zeigt das Sputum ein typisches Aussehen: es wird infolge der beigemischten roten Blutkörperchen und Leukocyten undurchsichtiger, wegen der Anwesenheit eines gerinnungsfähigen Eiweisskörpers, wahrscheinlich des Nucleïns (Kossel[17])) zäher und lässt wegen des vermehrten Blutgehaltes oft eine deutliche Rost- oder Ziegelfarbe erkennen. Doch ist diese Färbung keine konstante, sie hängt wesentlich von der Menge der beigemengten Blutkörperchen und von deren chemischen Veränderungen ab, so dass man oft einer grasgrünen Farbe (sog. biliöses Sputum) begegnet, die man mit wenigen Ausnahmen, wo Icterus mitspielt, als die letzte Oxydationsstufe des Hämatins aufzufassen berechtigt ist.

Im dritten Stadium, während der Lysis oder nach der Krisis, sobald die Verflüssigung, Resorption und Expektoration des Exsudates beginnt, gehen die erwähnten spezifischen Erscheinungen allmählich wieder verloren; die Sputa nehmen einen schleimig-eitrigen Charakter an, wie er beim Bronchialkatarrh die Regel bildet.

Die Kenntniss dieser Verhältnisse ist unerlässlich bei der Auswahl brauchbarer Nährböden, als welche die Sputa der beiden ersten Stadien der Pneumonie mit wenigen Ausnahmen gelten können, während die dritte Periode, wie ich öfter zu beobachten Gelegenheit hatte, einen dünnflüssigen, gelblichgrünen, vollvirulente Diplokokken enthaltenden Auswurf in grossen Mengen lieferte, der beim Sterilisieren in niederen Temperaturgraden keine Coagulation erkennen liess und bei stärkerer Erhitzung zu einer unbrauchbaren, mit zahllosen Bläschen durchsetzten Masse eintrocknete.

---

[17]) cfr. oben Anmerk. No. 15.

Der leichteren Beschaffung wegen habe ich die überwiegende Mehrzahl meiner Versuche mit pneumonischem Sputum anstellen müssen und nur einigemale über ein rein schleimiges verfügt, welches in seltenen Fällen in genügender Menge von manchen Gesunden des Morgens entleert wird.

Mancher Unterschiede dieser beiden Auswurfs-Arten werden wir uns bewusst bleiben müssen, wenn wir im folgenden zu einer Beschreibung der Herstellung geeigneter Sputum-Nährböden für bakteriologische Züchtungsversuche übergehen.

Hat man den Auswürf von den Kranken in geeigneten Gefässen auffangen und vor späterer Luftinfektion durch Zudecken möglichst schützen lassen, so ist zunächst dies Gemisch von allen fremden makroskopischen Teilen wie Speiseresten etc. soweit wie angängig zu befreien. Etwaige Luftbläschen, die sich oft in grosser Anzahl vorfinden, kann man schon jetzt zu entfernen versuchen, doch habe ich die Beobachtung gemacht, dass diese Bläschen beim Erhitzen (zum Zwecke der Sterilisation) grösstenteils an die Oberfläche treten und dann hier leicht auf mechanischem Wege durch vorsichtiges Abkratzen mit einem vorher ausgeglühten Platinspatel, wie man ihn zweckmässig zum Übertragen histologischer Schnitte verwendet, beseitigt werden können. Das so hergerichtete Material wurde in sterilisierte Reagenzgläser und in kleine Doppelschälchen gefüllt, von denen die letzteren eine grössere und bequemere Impffläche bieten und wegen der dünn ausgebreiteten Schicht des Substrates eine schnellere Coagulation desselben herbeiführen. Mischungen des auf solche Weise gewonnenen Sputums mit anderen Nährmedien, wie z. B. Agar-Agar habe ich — so verlockend es auch oft sein mag — absichtlich stets vermieden, um nicht künstlich eine Fehler-

quelle zu schaffen, welche die Resultate wesentlich modificieren könnte.

Die Sterilisation dieses Materials bietet je nach den verschiedenen Arten des Sputums einige Abweichungen. Der pneumonische Auswurf ist leicht zu behandeln. Man lässt ihn zuerst bei 65° (in den Reagenzgläsern schräg) erstarren und sterilisiert ihn dann durch diskontinuierliche Erhitzung 4 mal 2 Stunden bei ca. 60°. Das schleimige Sputum verlangt grössere Sorgfalt für eine genügende Sterilisation. Da es, wie H. Kossel angegeben, reich an Mucin ist, welches sich bei 60° in eine dünnflüssige Masse verwandelt, so darf hier der Erhitzungsgrad 55° nicht übersteigen. Aber auch bei dieser Wärmehöhe reicht schon eine 4 mal 2 stündige diskontinuierliche Sterilisation völlig aus, um recht befriedigende Resultate zu liefern. Da sich hierbei Aussehen und Konsistenz des Materials nicht im geringsten ändern, so hat man nur von vornherein auf diese beiden Eigenschaften besonders zu achten und nicht zu dünnflüssige Medien auszuwählen. Auf diese Weise erhält man stets gut sterilisierte Nährböden, die bei sorgfältiger Aufbewahrung lange unverändert bleiben, und deren sofortiger Verwendung nichts mehr im Wege steht.

Nachdem ich mir eine Reihe derartiger Sputum-Nährböden hergestellt hatte, begann ich sofort mit den Züchtungsversuchen, aus deren Ergebnissen ich sehen wollte, ob das Sputum, welches in unverändertem Zustande eine so reiche Bakterienvegetation einschliesst, auch nach den geringfügigen Modifikationen, welche eine genügende Sterilisation fordert, für verschiedene Bakterienarten günstige Wachstumsbedingungen bietet und somit verdient, in die Reihe der bisher gebräuchlichen Nährsubstrate ebenbürtig aufgenommen zu werden.

Ich begann meine Versuche mit der Züchtung von

Fränkel'schen Pneumokokken, aufgemuntert durch die überraschenden Resultate, welche Dr. Adolf Schmidt hier aufzuweisen hatte, und in der weiteren Absicht, die biologischen Verhältnisse dieses Mikroorganismus auf dem neuen Nährboden etwas eingehender zu studieren.

Über die Biologie des von A. Fränkel entdeckten Diplococcus pneumoniae besitzen wir ausführliche Studien, von denen die umfassendste, gründlichste und alle vorhergehenden Arbeiten möglichst berücksichtigende wohl die ist, welche von Kruse und Pansini aus dem bakteriologischen Laboratorium der zoologischen Station zu Neapel 1892 hervorging. Alle früheren Forschungen über diesen Mikroorganismus, welche hier durch genaue und erschöpfende Litteraturangaben belegt sind, werden noch einmal von den genannten Autoren an einem grossen Material von Tieren einer experimentellen objektiven Kritik unterzogen und in manchen wesentlichen Punkten erweitert oder richtig gestellt. Uns interessieren aus dieser grundlegenden Arbeit besonders alle die Angaben, welche über die mannigfachen Wachstumsverhältnisse der Diplokokken auf den verschiedensten Nährböden gemacht sind, und welche zum Vergleich mit meinen folgenden Versuchen herangezogen werden sollen.

Was zunächst Form und Anordnung betrifft, in der die Fränkel'schen Diplokokken auftreten, so sind sie keineswegs unter wechselnden Verhältnissen konstante. Die Form variiert von der typischen Kugelgestalt eines Streptococcus pyogenes bis zum bacillenähnlichen Aussehen eines Diplococcus lanceolatus. Nach Übertragung auf Nährböden, die das Wachstum ungünstig beeinflussen, wie z. B. auf Blutserum, erscheinen grosse kuglige Formen, die an Hefepilze erinnern. Ebenso different ist die Anordnung, welche sich im allgemeinen in der deutlichen Verbindung zu 2 Individuen zu erkennen giebt, aber nach längerer Zeit fortgesetzter Kultur auf künst-

lichen Nährböden sich immer mehr dem Kettenwachstum der Streptokokken nähert. Im allgemeinen gilt hier die Regel, dass mit dieser fortschreitenden Degeneration in Form und Anordnung auch die Virulenz der Bakterien abnimmt, welche ihren Höhepunkt in der als Diplococcus lanceolatus bezeichneten Varietät erreicht.

Eine häufig wechselnde, in ihren Ursachen noch wenig aufgeklärte Eigentümlichkeit der Pneumokokken besteht in einer deutlichen Kapselbildung (Diplococcus capsulatus), die in den frischen Teilen entzündeter Lungen am intensivsten ausgeprägt ist. Während diese Kapselbildung im tierischen Organismus ausnahmslos stattfindet, und hier das Auffinden der Pneumokokken bei geeignetem Färbungsverfahren ungemein erleichtert, fehlt sie bei den meisten, jedoch durchaus nicht bei allen Arten nach Züchtung auf künstlichen Nährböden. Anders liegen hinwiederum die Verhältnisse bei Kulturen auf Blutserum oder in Milch, wo in den meisten Fällen die Pneumokokken in einer deutlichen Kapsel liegen, wie schon Ortmann[18]) und Guarnieri[19]) gefunden. Ich kann diese Gelegenheit nicht vorübergehen lassen, ohne nachdrücklich auf die wichtigen Differenzen hingewiesen zu haben, welche zwischen den Kulturen auf künstlichen und denen auf natürlichen Nährmedien schon in ihren morphologischen Charakteren bestehen, und welche wie hier — kapselfreie Kokken auf künstlichen, kapseltragende Kokken auf natürlichen Nährsubstraten und im Organismus — für Art, Dauer, Verlauf etc. der Pneumokokken-Infektion sicherlich nicht ohne Bedeutung sein werden.

An seine Nährböden stellt der Diplococcus pneu-

---

[18]) Ortmann, Beitrag zur Ätiologie der akuten Cerebrospinal-Meningitis. Arch. f. exper. Path. u. Pharm., Bd. XXIV, 1888.

[19]) Guarnieri, Studii sulla etiologia della pneumonite. Atti della R. Acad. med. di Roma 1888. Vol. IV, Serie II.

moniae als Hauptforderung einen gewissen schwachen Alkalescenzgrad, der bei den einzelnen Varietäten wechselt, deshalb vorher niemals genau bestimmt werden kann und die Züchtung dieses Mikroparasiten nicht unerheblich erschwert. Oft besitzt der Fleischsaft direkt bakterienfeindliche Eigenschaften.

Mit Ausnahme der Kartoffeln hat man fast auf allen gebräuchlichen Nährböden ein Wachstum der Pneumokokken beobachtet, welches sich auf der Oberfläche von Agar-Agar oder Blutserum makroskopisch als ein äusserst feiner, durchsichtiger, glänzender, „wie aus einzelnen Tautröpfchen zusammengesetzter" Belag darstellt. In Bouillon bildet sich zunächst eine gleichmässige Trübung, dann ein sandartiger Niederschlag, der aus Bakterien besteht. Das Temperatur-Optimum für das Wachstum liegt bei 35° C. Auf der Agar-Oberfläche ist gewöhnlich in 2—3 Tagen, spätestens nach 1 Woche die gesamte Kultur abgestorben, während in den tieferen Schichten die Lebensdauer eine längere zu sein pflegt. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Bouillon- und Blutserumkulturen und bei den im Tierkörper fortgezüchteten Arten. Im flüssigen pneumonischen Sputum gehen die Diplokokken, von den Saprophyten überwuchert, schon nach 3—4 Tagen zu grunde, im getrockneten sollen sie (nach Bordoni-Uffreduzzi[20])) 2 Monate lang ihre pathogenen Eigenschaften bewahren. Über die Virulenz der Diplokokken wissen wir, dass sie im grossen und ganzen ziemlich konstant ist und weder durch das Alter einer Kultur, auch wenn dieselbe durch eine verschiedene Anzahl von Tieren gegangen ist, noch durch Austrocknen in nennenswerter Weise beeinflusst wird. Dass erhöhte Temperaturen schnell ab-

---

[20]) Bordoni-Uffreduzzi, Über die Ätiologie der Otitis media. Centralblatt für Bakter. 1890. Bd. VII, S. 529, 556, 895.

schwächend wirken, wie Fränkel und Biondi[21]) angeben, wird von anderer Seite bestritten. Einen Maassstab für die verschiedenen Grade der Virulenz liefern die Reaktionen, welche nach subkutaner Injektion an Tieren von gleicher Grösse an entsprechender Körperstelle und mit derselben Menge auftreten und sich bei Kaninchen in letalem Ausgang nach 2 Tagen oder nach späterer Zeit. (bis 15 Tagen) unter dem Bilde der Septikämie oder in lokalen Veränderungen (Abscessbildung, Ulcerationen) zu erkennen geben. Für die künstliche Infektion zeigen sich Kaninchen und Mäuse am empfänglichsten. Diese kurzen Daten mögen als oberflächliche Orientierung über die biologischen Verhältnisse der Fränkel'schen Diplokokken genügen.

Meine Versuchsanordnung gestaltet sich nun folgendermassen: Aus frischem, pneumonischem Sputum, welches nach mikroskopischer Prüfung in hinreichender Menge Diplokokken enthielt, wurde ein Flöckchen entnommen, in mehreren Schälchen mit sterilisiertem Wasser gut ausgespült, zerzupft und einer weissen Maus intraperitoneal injiciert. Das Tier, welches gewöhnlich innerhalb von 24 Stunden einer Septikämie erlegen war, wurde dann unter allen anti- und aseptischen Kautelen seciert, das Blut mikroskopisch auf Pneumokokken untersucht und bei genügender Anwesenheit derselben — am besten verwendet man hierzu das Milzblut — auf die Nährböden in dünner Schicht ausgestrichen. Zur Kontrolle wurden neben 2 Sputum-Nährböden 2 Reagenzgläschen mit Agar und eines mit Bouillon gleichzeitig geimpft und beobachtet. Die Färbung sämtlicher mikroskopischen Deckglaspräparate geschah, um eine gleich-

---

[21]) Biondi, Die pathogenen Mikroorganismen des Speichels. Zeitschr. f. Hyg. Bd. II, 1887, Heft 2, S. 194.

mässige Betrachtung der Objekte zu ermöglichen, mit folgender Lösung, welche etwaige Kapseln sehr deutlich zur Anschauung bringt:

Gentianaviolett	2,0
Acid. carbol.	10,0
Alcohol	20,0
Aq. destill.	ad 200,0

Die geimpften Nährmedien wurden im Brütofen bei einer Temperatur von 35° C. gehalten.

Ich hatte, Dank dem grossen Krankenmaterial der Abteilung des Herrn Geheimrat Gerhardt, Gelegenheit, nach diesem Plane 14 verschiedene Fälle von fibrinöser Pneumonie für meine Versuche zu benutzen, welche zwar aus verschiedenen Gründen nicht sämtlich bis zu Ende durchgeführt werden konnten, die jedoch zur Begründung der gefundenen Resultate völlig ausreichten und folgende Ergebnisse lieferten.

Das Wachstum der Kulturen auf pneumonischem Sputum stellt sich nach 24 Stunden makroskopisch als ein feiner durchsichtiger glänzender Belag ganz ähnlich dem Wachstum auf den künstlichen Nährböden dar, doch während bei diesen letzteren der Belag sich nur wenige Millimeter vom Impfstrich entfernt, bedeckt er bei den Sputum-Nährmedien meist einen grossen Teil der Oberfläche. Auf Bronchialschleim ist wegen der glänzenden durchsichtigen Masse des Mediums makroskopisch ein Wachstum der Diplokokken nicht zu erkennen.

Die mikroskopische Besichtigung gefärbter Deckglaspräparate von Kulturen auf pneumonischem Sputum zeigt auf den ersten Blick grosse plumpe Bakterien von lanzettförmiger Gestalt, von denen je 2 in einer deutlichen Kapsel liegen. Diese Kapsel färbt sich mit der oben analysierten Farblösung schwach violett, ist länglich oval und bildet öfter mit anderen unmittelbar

anliegenden kleine Zoogloea. In einigen Fällen fiel eine ausgesprochene kettenförmige Anordnung der einzelnen Glieder auf.

Alle diese Verhältnisse gleichen in frappanter Weise denen der Kulturen auf menschlichem Blutserum, welche ich zur Vergleichung anlegte, und die durch diese Identität ihrer morphologischen Veränderungen den Beweis erbrachten, eine wie nahe chemische Verwandtschaft zwischen Blutserum und pneumonischem vorkritischem Sputum besteht, was auch keineswegs wunderbar erscheinen kann.

Die Bedingungen für die Kapselbildung der Diplokokken auf gewissen Nährmedien sind sicherlich chemischen Einflüssen zuzuschreiben, deren Ergründung schwierig ist und noch aussteht, die jedoch der Forschung thatsächlich nicht so unzugänglich sind, wie man allgemein glaubt. Haben doch z. B. neuerdings die hochinteressanten Versuche[22]), die im Pasteur'schen Institute zu Paris angestellt wurden, durch das positive Resultat, dass der Bacillus pyocyaneus zur Bildung seines grünen fluorescierenden Farbstoffes stets einer gewissen Menge phosphorsauren Salzes bedarf, die Lösung mancher bakteriochemischen Aufgaben in naher Zukunft wahrscheinlich gemacht.

Der eigentümliche Wechsel in der Kapselbildung der Diplokokken auf künstlichen und natürlichen Nährböden liess weitere Versuche in dieser Richtung nicht vergeblich und uninteressant erscheinen. Ich übertrug zunächst kapselfreie Kulturen, die auf Agar gewachsen waren, auf pneumonisches Sputum und konnte in allen (4) Fällen eine neue kapseltragende Generation entstehen sehen, welche, auf Agar zurückgebracht, unweigerlich

---

[22]) M. Gessard, Sur la fonction fluorescigène des microbes. Annales de l'institut Pasteur 1892. S. 801.

wiederum die gallertige Hülle einbüsste. Anders gestalteten sich die Resultate der Experimente auf Bronchialschleim. Hier gelang es mir, nur dann eingekapselte Individuen zur Entwicklung zu bringen, wenn dieselben als solche schon übertragen waren, während von kapselfreien Diplokokken stets eine durchaus gleichgeartete Nachkommenschaft erzeugt ward. Pneumokokken aus dem Mäuseblut liessen demnach auf dem Bronchialschleim ebenso wie auf pneumonischem Sputum jene oben geschilderten grossen plumpen, kapseltragenden Formen entstehen, welche alle Kulturen auf natürlichen Nährböden so deutlich charakterisieren; aber, während Agar- oder Bouillonkulturen auf pneumonischem Auswurf sich zu kapselführenden Individuen umwandelten, behielten sie auf Bronchial-Sputum alle Eigenschaften der Muttergeneration.

Die Lebensdauer der Pneumokokken auf pneumonischem Sputum ist gegenüber der auf den künstlichen Nährböden etwas erhöht. Während auf diesen letzteren durchschnittlich nach 2—3 Tagen die gesamte Kultur abgestorben ist, lassen Gelatineplatten noch nach 4 bis 5 Tagen eine grosse Anzahl der auf dem Auswurf gezüchteten Keime zur Entwicklung gelangen. Dies gilt jedoch nur von den Oberflächen-Kulturen, wie sie auf Sputum ausschliesslich angelegt werden können; die Keime der tiefer gelegenen Partieen sollen nach früheren Versuchen — wie schon oben gesagt — ihre Lebenskraft länger (bis 4 Wochen) behalten.

Zur Vervollständigung unserer Kenntnisse von den biologischen Eigenschaften der Pneumokokken auf Sputum-Substraten blieb noch eine Aufgabe von grosser Bedeutung und von praktischem Interesse zu lösen übrig, die Prüfung der Virulenz.

Im allgemeinen stimmt der Virulenzgrad der Kulturen auf pneumonischem Sputum mit dem der Agar-

Kulturen überein d. h. weisse Mäuse erliegen der Infektion spätestens 48 Stunden nach der Impfung unter dem typischen Bilde der Pneumokokken-Septikämie. Man kann diese Kulturen als vollvirulente bezeichnen. Der zweite Virulenzgrad ist durch eine Verzögerung des letalen Ausganges charakterisirt und tritt fast immer während des Absterbens einer Pneumokokken-Kultur oder unter gewissen anderen Umständen ein. Man kann hier nicht immer mit Bestimmtheit sagen, ob diese verzögerte Reaktion des Tierkörpers aus der Produktion abgeschwächter Toxine oder daraus resultiert, dass nur eine geringe Anzahl virulenter Organismen übertragen wird, welche die Zeit von der Infektion bis zum Tode des Tieres für ihre Entwicklung und Vermehrung in Anspruch nehmen. Im ersten Falle handelt es sich um eine reichliche Produktion eines abgeschwächten Virus, im zweiten um eine geringe, erst allmählich sich steigernde Produktion eines vollvirulenten Giftes. Wenn wir ferner bedenken, wie ungleichartig der tierische Organismus auf diese bakteriellen Gifte reagiert, so können wir die Schwierigkeiten begreifen, welche sich uns bei einer exakten Bestimmung und Erklärung der verschiedenen Virulenzgrade entgegenstellen. Unter den dritten Virulenzgrad würden alle die Fälle zu begreifen sein, in welchen das Leben des Tieres erhalten bleibt, und in denen es meist zweifelhaft ist, ob der Organismus eine Infektion überstanden hat oder ob überhaupt keine Gifte gebildet sind. Diese Erwägungen müssen hier um so mehr Beachtung finden, als wir es bei den Pneumokokken mit Organismen zu thun haben, deren Existenz in unseren künstlichen Kulturen meist nur auf wenige Tage beschränkt ist.

Bei der Unsicherheit dieser „absoluten“ Bestimmung der verschiedenen Virulenzgrade versuchte ich einen anderen Weg einzuschlagen, der im Gegensatz zu dem ersten gewissermassen nur „relative“ Werte liefert, aber

für das Zustandekommen der natürlichen Infektion beim Menschen nicht ohne Bedeutung sein dürfte.

Der natürliche Infektionsweg aller bakteriellen Lungenerkrankungen wird in der Hauptsache durch die Atmungswege gebildet, mit welchen in ihrem oberen Drittel die Mundhöhle durch den Isthmus faucium communiciert. Geschieht die Infektion durch Atmung, Speiseaufnahme oder durch andere mehr zufällige Ursachen vom Munde aus, so werden hier die Krankheitserreger mit dem meist reichlich vorhandenen Speichel in Berührung kommen. Dass dies öfter stattfindet, scheinen die Entdeckungen von Netter, Miller und Biondi zu beweisen, welche im Speichel völlig gesunder Menschen Pneumokokken fanden. Es musste weiter von Interesse sein, die Einwirkung des Speichels auf diese Mikroorganismen eingehender zu studieren. Sanarelli[23]) hat dies in umfangreichem Maasse gethan und ist zu dem Resultat gekommen, dass „der menschliche Speichel ein durchaus ungünstiger Nährboden für gewisse pathogene Mikroorganismen ist, welche er mehr oder weniger rasch zerstört, dass er aber trotzdem die Entwicklung gewisser Arten (so z. B. der Pneumokokken) zulässt, jedoch ihren normalen Typus ändert, sie abschwächt oder auch gänzlich unwirksam macht".

Meine Versuchsanordnung gestaltete sich nun folgendermassen: Von einer eintägigen, aus dem Milzblut einer geimpften Maus angelegten Reinkultur von Pneumokokken auf Agar-Agar, welche eine Maus nach 24 Stunden an Septikämie tötete, also vollvirulent war, wurden 3 Reagenzgläschen mit sterilisiertem Speichel und 3 mit sterilisiertem pneumonischem Sputum geimpft. Der Speichel zeigte alkalische Reaktion, enthielt reichlich Mucin, Spuren von Rhodankalium und wurde durch

---

[23]) Centralblatt f. Bakteriologie 1891. Bd. X, S. 817.

diskontinuierliche Erhitzung, in ähnlicher Weise wie oben für das Sputum angegeben, sterilisiert. Nach 24 Stunden zeigten alle 3 Speichelkulturen und 2 von den Sputum-Kulturen durch mikroskopische Untersuchung ein deutliches Wachstum der Pneumokokken an. Es wurden nun von jeder dieser beiden verschiedenartigen Kulturen je 3 Mäuse geimpft und zwar so, dass 0,1 ccm Speichel direkt und von den Sputum-Kulturen die gleiche Menge einer Aufschwemmung in sterilisiertem Wasser intraperitoneal injiciert wurde. Diese Aufschwemmung war so hergestellt worden, dass in 1 ccm Wasser eine Platinöse der erwähnten Kultur verrührt war. Ferner wurden von diesen selben Speichelkulturen 2 neue auf pneumonischem Sputum angelegt, welche beide nach 24 Stunden mikroskopisch ein Wachstum der Pneumokokken zeigten, und von denen dann in der eben beschriebenen Art weiterhin 3 Mäuse geimpft wurden.

Die Resultate dieser Versuche zeigt folgende Tabelle:

No.	Art des Impfstoffes	Tod nach Tagen	Sektionsbefund
1. Maus	Speichel-Kultur (eintägig)	4	Pneumokokken-Septikämie
2. Maus			
3. Maus			
4. Maus	Sputum-Kultur (eintägig)	1	Pneumokokken-Septikämie
5. Maus		2	
6. Maus		1	
7. Maus		1	
8. Maus	Von Speichel auf Sputum übertragene Kultur	nach 2 Tagen durch Chloroform getötet	Keine Veränderungen
9. Maus		bleibt am Leben	

Durch diese wenigen Vorversuche wurden zunächst die Sanarelli'schen Experimente bestätigt. Auch ich fand die Virulenz der im Speichel gezüchteten Pneumokokken abgeschwächt. Ich hatte ferner durch Über-

tragung dieser abgeschwächten Speichel-Kulturen auf pneumonisches Sputum die ursprüngliche volle Giftigkeit der Pneumokokken wiederzuerlangen versucht, kann jedoch hier über definitive Resultate nicht berichten; denn dem einen Fall, in welchem es gelungen scheint, stehen 2 negative gegenüber.

Eine zweite Versuchsreihe mit einigen geringfügigen, das Princip der obigen Anordnung nicht wesentlich berührenden Variationen, gestaltete sich folgendermassen: Das Milzblut einer 24 Stunden nach der Injektion an Pneumokokken-Septikämie zu grunde gegangenen Maus wird direkt auf Agar und Speichel verimpft. Beide Nährböden liefern nach 1 Tage Reinkulturen, von denen die im Speichel zur intraperitonealen (0,1 ccm) Injektion zweier Mäuse und gleichzeitig zu einer weiteren Übertragung auf Sputum benutzt wird. Beide Tiere sind nach 24 Stunden gestorben und zeigen bei der Sektion keine abnormen Veränderungen, so dass man zur Annahme genötigt wird, dass hier toxische Eigenschaften des Speichels im Spiele waren.

Es werden ferner 2 Mäuse mit der oben erwähnten Sputum-Kultur, welche vom Speichel stammte, und 2 andere Mäuse mit einer zweitägigen verdünnten Speichelkultur geimpft. Die beiden ersten sterben gleichzeitig nach ca. 30 Std., die beiden anderen nach ca. 40 Std., alle an hochgradiger Pneumokokken-Septikämie.

Weiter wird eine viertägige Speichelkultur zur Verimpfung auf 2 Mäuse verwandt, von denen die eine nach 6 Tagen an Septikämie zu grunde geht, während die andere am Leben bleibt.

Folgende Tabelle mag die Übersichtlichkeit dieser Versuche erleichtern:

No.	Art und Alter des Impfstoffes	Tod nach Stunden	Sektionsbefund
1. Maus 2. Maus	eintägige Speichelkultur (vom Milzblut einer Maus)	24	Keine Veränderungen (toxische Wirkung des Speichels).
3. Maus 4. Maus	eintägige Sputumkultur (von obiger eintägiger Speichelkultur übertragen)	30	Pneumokokken-Septikämie
5. Maus 6. Maus	zweitägige verdünnte Speichelkultur	40	
7. Maus 8. Maus	viertägige Speichelkultur.	6 Tagen bleibt am Leben	Pneumokokken-Septikämie

Soviel geht aus diesen Versuchen unzweifelhaft hervor, dass die Virulenz der im Speichel gezüchteten Pneumokokken mit dem Alter der Kultur abnimmt. Die Übertragungen von Speichelkulturen auf Sputum und die Prüfung der Virulenz dieser neuen Generation liefern auch hier keine einheitlichen Resultate, doch scheint es, (wie Maus 3 und 4 bezeugen), als ob eine geringe Zunahme der Virulenz stattfinde, wenn die Individuen schon mit einem gewissen Grade von Giftigkeit übertragen werden.

Es scheint somit dem menschlichen Organismus im Speichel ähnlich wie im Blut ein starkes Abwehrmittel gegen zahllose bakterielle Angriffe gegeben zu sein, welche speciell bei der Pneumokokken-Infektion nur unter gewissen erschwerenden Umständen, deren Gesetzmässigkeit wir bisher noch nicht klar erkannt haben, gefährlich werden können.

Als die Maus No. 8, welche mit einer viertägigen Speichelkultur geimpft und am Leben geblieben war, des weiteren mit einer frischen vollvirulenten Pneumokokken-Kultur geimpft wurde, zeigte sie sich dieser erneuten Infektion gegenüber als immun. Sie war also

durch die abgeschwächte Speichelkultur immunisiert worden. Dies interessante Resultat forderte zu weiteren Versuchen nach dieser Richtung hin auf, über welche demnächst gesondert berichtet werden soll.

Die positiven Ergebnisse der Kulturversuche von Pneumokokken auf Sputum liessen weitere Experimente, welche in der Züchtung einiger anderer pathogener Bakterien bestanden und den allgemeinen Wert des neuen Nährbodens bestimmen helfen sollten, nicht vergeblich erscheineu.

Der Streptococcus pyogenes, einem septischen Uterus entstammend, bildet makroskopisch längs des Striches auf pneumonischem Sputum kleine, weisslich-graue Punkte, welche, wie es auch auf der Agar-Oberfläche zu sein pflegt, niemals confluieren. Wegen des fast gleichfarbigen Sputum-Untergrundes sind diese isolierten Kolonien oft schwer zu erkennen. Eine Verflüssigung des Nährbodens findet nicht statt. Die mikroskopischen Ausstrichpräparate zeigen sehr kurze Kokkenfäden, die oft nur aus wenigen Individuen bestehen und sich netzartig verästeln.

Der Staphylococcus pyogenes aureus, aus Empyem-Eiter gezüchtet, liefert auf der Oberfläche des Sputums einen dicken, weisslich-gelben, glänzenden Belag, der an seinen Rändern scharf abgegrenzt ist und sich erst allmählich gelber färbt. Eine Verflüssigung des Nährbodens findet nicht statt. Die mikroskopischen Bilder dieser Kulturen unterscheiden sich in keiner Weise von den auf künstlichen Substraten.

Die Diphtheriebacillen, welche von einer dreiwochenalten Agar-Reinkultur auf Sputum übertragen wurden, liessen hier nach 48 Stunden einen dicken, weisslichen Überzug entstehen, der sich allmählich über die

ganze Oberfläche ausbreitete und langsam unter sich das Substrat verflüssigte, so dass sich nach 8 Tagen im Reagenzglase drei verschiedene Schichten gebildet hatten, von denen die unterste einen dicken, grauen Bodensatz, die mittelste eine hellbraune, klare Flüssigkeit und die oberste eine weisslich-graue, dicke, glanzlose Kahmhaut darstellte. Mikroskopisch betrachtet, bestand diese Haut aus dicht an einander gelagerten, gleichmässig starken Bacillen, welche im Gegensatz zu der ursprünglichen Agarkultur nirgends die typischen, an ihren Enden kolbig verdickten Involutionsformen der Diphtheriebacillen erkennen liessen. Übrigens gelang die Färbung dieser Präparate weit besser mit saurem Gentianaviolett als mit Löffler'schem Methylenblau.

Wenn ich mir am Schluss dieser Ausführungen ein Urteil über den Wert der Sputum-Nährböden und über ihre Stellung in der Reihe der bisher allgemein gebräuchlichen Nährsubstrate erlauben darf, so muss ich es als erwiesen betrachten, dass mit dem Sputum in die bakteriologische Praxis ein natürliches Nährmedium eingeführt ist, welches verschiedenen Bakterienarten (Pneumokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Diphtheriebacillen) eine gedeihliche Entwicklung sichert, und welches bei der Züchtung einer dieser Arten, der Pneumokokken, gegenüber ihren Kulturen auf den künstlichen Nährböden einige sicher nicht zufällige oder nebensächliche Modifikationen in den biologischen Eigenschaften dieser Bakterienart aufweist. Ich habe deshalb in vorliegender Arbeit die Züchtung der Pneumokokken auf Sputum bevorzugt, um durch zahlreiche Versuche diese Modifikationen genauer zu eruieren und damit den Wert des neuen Nährbodens für das Studium der Biologie dieser Bakterien hervorzuheben. Den Vorzug als natürliches Substrat, welches dem tierischen Organismus ent-

stammt, teilt das Sputum mit dem Blutserum und Harn und neben diesen würde es die gebührende Stelle unter den gebräuchlichen Nährmedien finden.

Bei der Züchtung pathogener Bakterien wird es stets unser Hauptbestreben sein müssen, die Bedingungen, denen diese Individuen im tierischen Organismus ihr Fortkommen verdanken, auch ausserhalb desselben herzustellen. Für viele dieser Bakterienarten schafft uns das Sputum jene Bedingungen, und es bleibt zu erwarten, wie die Züchtung anderer Mikroorganismen z. B. der Tuberkelbacillen auf diesem neuen Nährmedium ausfällt, um die Hoffnungen, die ich nach dieser Richtung hin hege, zu verwirklichen.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Dr. Adolf Schmidt in Bonn für die Anregung zu dieser Arbeit, Herrn Geheimrat Prof. Dr. Gerhardt für Überlassung des Materials und Herrn Stabsarzt Dr. Grawitz für die umfangreiche Beihilfe und Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Litteratur.

Schmidt, Über die Benutzung verschiedener Sputa als Nährböden und das Wachstum der Pneumokokken auf denselben. Centralblatt für klinische Medicin 1893, No. 30.

Schmidt, Über Farbenreaktionen des Sputums. Berliner klinische Wochenschrift 1893, No. 10.

Kaatzer, Das Sputum und die Technik seiner Untersuchung. 1891.

Hüppe, Die Methoden der Bakterienforschung. 1891.

Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1893.

Eisenberg, Bakteriologische Diagnostik. 1891.

Kruse und Pansini, Untersuchungen über den Diplococcus pneumoniae und verwandte Streptokokken. Zeitschrift f. Hyg., Bd. XI, 1892, p. 279.

Sanarelli, Der menschliche Speichel und die pathogenen Mikroorganismen der Mundhöhle. Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 10, No. 25.

Thesen.

I.

Für das Studium der Biologie pathogener Bakterien haben die natürlichen Nährmedien, welche (wie z. B. das Sputum) dem tierischen Körper entstammen, einen ungleich grösseren Wert wie die künstlichen Nährsubstrate.

II.

Die erste Anlage der Ovarialkystome geht vom Follikelepithel aus.

III.

Das Bacterium coli commune kann unter gewissen Bedingungen zum Erreger des Ileotyphus werden.

Lebenslauf.

Verfasser, Willibald Erdmann Theodor Steffen, evangelischer Konfession, Sohn des Veterinär-Assessors Albert Steffen wurde am 17. März 1869 zu Soldin in der Neumark geboren. Er besuchte die Gymnasien zu Frankfurt a. O., Stettin und Magdeburg, und verliess letzteres Ostern 1890 mit dem Zeugnis der Reife, um sich dem Studium der Medicin zu widmen. Er wurde Ostern 1890 in Greifswald immatrikuliert und bestand ebendort nach viersemestrigem Studium die ärztliche Vorprüfung. Seiner Militärpflicht genügte er vom 1. April bis 1. Oktober 1892 bei der 9. Kompagnie des 42. Inf.-Regts. (Prinz Moritz von Anhalt-Dessau) in Greifswald. Am 21. Oktober 1892 wurde er auf der Königlichen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin immatrikuliert und bestand am 23. Februar 1894 das Examen rigorosum.

Während seiner Studienzeit besuchte er die Vorlesungen, Kliniken und Kurse folgender Herren Professoren und Docenten:

In Greifswald: Ballowitz, Gerstaecker, Limpricht, Oberbek, Landois, Schmitz, Solger, Sommer.

In Berlin: v. Bardeleben, v. Bergmann, Gerhardt, Grawitz, Gusserow, Klemperer, Liebreich, Schweninger, Senator, Silex, R. Virchow, Winter.

Allen diesen Herren, seinen hochverehrten Lehrern, spricht Verfasser seinen ehrerbietigsten Dank aus.